



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of: Nakamura et al.	
	Art Unit: 1632
Application No.: 10/720,177	Examiner: [to be assigned]
Filing Date: November 25, 2003	Atty. Docket: US-110
Title: Method for producing L-glutamine and L-glutamine producing bacterium	

CLAIM FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. § 119 IN UTILITY APPLICATION

Commissioner of Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450


Sir:

Priority under 35 U.S.C. § 119 is hereby claimed to the following priority document(s), filed in a foreign country within one (1) year prior to the filing of the above-referenced United States utility patent application (35 U.S.C. § 172):

Country	Priority Document Appl. No.	Filing Date
Japan	2002-342287	November 26, 2002

A certified copy of each listed priority document is submitted herewith. Prompt acknowledgment of this claim and submission is respectfully requested.

Respectfully submitted,



Shelly Guest Cermak
Reg. No. 39,571

Date: April 6, 2004
PTO Customer Number: **000038108**
Ajinomoto Corporate Services, LLC
1120 Connecticut Avenue
Ste. 1010
Washington, D.C. 20036
202.457.0284

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 2 年 1 1 月 2 6 日
Date of Application:

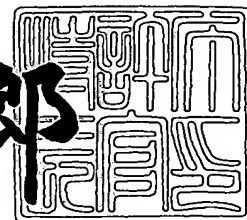
出 願 番 号 特 願 2 0 0 2 - 3 4 2 2 8 7
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 2 - 3 4 2 2 8 7]

出 願 人 味の素株式会社
Applicant(s):

2 0 0 3 年 7 月 1 0 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



【書類名】 特許願

【整理番号】 P-B0262

【提出日】 平成14年11月26日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12P 13/06

【発明の名称】 L-グルタミンの製造法及びL-グルタミン生産菌

【請求項の数】 9

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社内

【氏名】 中村 純

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社内

【氏名】 秋山 嘉代

【特許出願人】

【識別番号】 000000066

【氏名又は名称】 味の素株式会社

【代理人】

【識別番号】 100089244

【弁理士】

【氏名又は名称】 遠山 勉

【選任した代理人】

【識別番号】 100090516

【弁理士】

【氏名又は名称】 松倉 秀実

【選任した代理人】

【識別番号】 100100549

【弁理士】

【氏名又は名称】 川口 嘉之

【連絡先】 0 3 - 3 6 6 9 - 6 5 7 1

【手数料の表示】**【予納台帳番号】** 012092**【納付金額】** 21,000円**【提出物件の目録】****【物件名】** 明細書 1**【物件名】** 図面 1**【物件名】** 要約書 1**【プルーフの要否】** 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 L-グルタミンの製造法及びL-グルタミン生産菌

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 L-グルタミン生産能を有し、かつ、細胞内のグルタミナーゼ活性が低下するように改変されたコリネ型細菌。

【請求項 2】 染色体上のグルタミナーゼ遺伝子が破壊されたことにより、グルタミナーゼ活性が低下した請求項 1 に記載のコリネ型細菌。

【請求項 3】 グルタミナーゼ活性が、0.1 U/mg 菌体タンパク質以下である請求項 1 又は 2 に記載の細菌。

【請求項 4】 菌体タンパク質当たりのグルタミナーゼ活性がグルタミンシンテターゼ活性と同じか又はそれ以下である請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の細菌。

【請求項 5】 さらに細胞内のグルタミンシンテターゼ活性が増強するように改変された請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の細菌。

【請求項 6】 グルタミンシンテターゼ活性の増強が、グルタミンシンテターゼ遺伝子の発現量の増強によるものである請求項 5 に記載の細菌。

【請求項 7】 グルタミンシンテターゼ遺伝子の発現量の増強が、グルタミンシンテターゼをコードする遺伝子のコピー数を高めること、又は前記細菌細胞内のグルタミンシンテターゼをコードする遺伝子の発現が増強されるように同遺伝子の発現調節配列を改変することによるものである請求項 6 に記載の細菌。

【請求項 8】 請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の細菌を培地に培養し、該培地中にL-グルタミンを生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とするL-グルタミンの製造法。

【請求項 9】 コリネ型細菌のグルタミンシンテターゼ遺伝子であって、-35領域の配列がTTGCCAであり、-10領域の配列がTATAATであるグルタミンシンテターゼ遺伝子。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、コリネ型細菌のL-グルタミン生産菌およびL-グルタミンの製造法に関する。L-グルタミンは、調味料、肝機能促進薬、アミノ酸輸液、および総合アミノ酸製剤などの成分として、産業上有用なアミノ酸である。

【0002】

【従来の技術】

発酵法によってL-アミノ酸を製造するには、微生物の育種改良法が多用されてきた。すなわち、野生株そのもののL-アミノ酸生産の生産能は極めて低い場合が多いので、突然変異により栄養要求性、アナログ耐性、もしくは代謝調節変異を付与したり、又はこれらを組み合わせる方法が知られている。L-グルタミンの場合も、上述の方法によれば、それなりの収量でL-グルタミンは得られるが、工業的に安価にL-グルタミンを製造する為には、さらに発酵収率を向上させることが不可欠である。

【0003】

一方、組換えDNA技術によりL-アミノ酸の生産能を増加させる種々の技術が開示されている。例えば、L-アミノ酸生合成に関与する酵素の活性を増強したり、L-アミノ酸の分解に関与する酵素の活性を低下させる技術が知られている。L-グルタミンについては、例えばグルタミンシンターゼが増強されたコリネ型細菌を用いてL-グルタミンを製造する方法（特許文献1）が開示されている。また、コリネ型細菌のグルタミン生合成および分解に関与する酵素及びその遺伝子として、グルタミンシンターゼ（非特許文献1）、グルタミン・2-オキソグルタル酸アミノトランスフェラーゼ（非特許文献2）をコードする遺伝子が既に報告されている。

【0004】

コリネ型細菌では、上記の遺伝子以外にもL-グルタミンの分解に関与する酵素の存在が示唆されている（非特許文献3）。しかしながら、この酵素は、アンモニウムイオンおよび低pHにより阻害を受けるとされており、アンモニウムイオンを著量必要とするグルタミン発酵においてはほとんど機能していないと考えられてきた。

【0005】

また、L-グルタミンを分解する酵素として、L-グルタミンを加水分解する酵素であるグルタミナーゼ（グルタミン アミドヒドロラーゼ (glutamine amidohydrolase)）が知られている。グルタミナーゼをコードする遺伝子は、シュードモナス属細菌（非特許文献4）、アスペルギルス・オリゼ（非特許文献5、特許文献2）、リゾビウム・エツリ（*Rhizobium etli*）（非特許文献6）、ラット（非特許文献7）等で報告されている。さらに、エシェリヒア・コリでは、グルタミナーゼ遺伝子の相同遺伝子の存在が報告されている（非特許文献8）。しかし、コリネ型細菌ではグルタミナーゼをコードする遺伝子は特定されておらず、その変異がグルタミンの生産に与える影響は知られていなかった。

【0006】

ところで、遺伝子のプロモーター配列を改変することにより、遺伝子の発現を増強する方法が知られている（特許文献3）。また、コリネ型細菌のグルタミンシンテターゼをコードする遺伝子として、*glnA*が明らかにされている（非特許文献9）。さらに、同遺伝子の転写開始点は、プロモーター領域も含めて明らかにされている（非特許文献10）。しかし、グルタミンシンテターゼをコードする遺伝子については、プロモーター配列の改変により発現を増強させることは知られていない。

【0007】

【特許文献1】

欧州特許公開第1229121号 (EP 1 229 121 A2)

【特許文献2】

欧州特許公開第1077256号 (EP 1 077 256 A1)

【特許文献3】

特開2000-818935

【非特許文献1】

Genbank Accession No. Y13221

【非特許文献2】

Genbank Accession No. AB024708

【非特許文献3】

Amino Acids, 7, 73-77, 1963

【非特許文献 4】

FEMS Microbiol. lett. 178(2)327-335(1999)

【非特許文献 5】

Appl. Microbiol. Biotechnol. 54, 59-68 (2000)

【非特許文献 6】

Biochim. Biophys. Acta, 1444(3): 451-6, 1999

【非特許文献 7】

J. Biol. Chem. 266(28), 18792-18796 (1991)

【非特許文献 8】

J. Biol. Chem. 243(5) 853-878(1968)

【非特許文献 9】

FEMS Microbiology Letters 154, 81-88, 1997

【非特許文献 10】

FEMS Microbiology Letters, 205, 361-367, 2001

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、コリネ型細菌の L-グルタミン分解能を低下させることにより L-グルタミン生産能を向上させ、当該特性を有する菌株を用いた L-グルタミンの製造法を提供することを課題とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記問題点を解決すべく鋭意検討を行った結果、グルタミナーゼ遺伝子をコードする遺伝子を同定すると同時に、グルタミナーゼ活性が低下した菌株では、該活性が野生株並である菌株に比べて、L-グルタミン生産能において優れていることを見出した。また、グルタミナーゼ活性の弱化とグルタミンシンテターゼ活性の増強を組合みわせることにより、さらに L-グルタミンの生産能を向上できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0010】

すなわち本発明は、以下のとおりである。

(1) L-グルタミン生産能を有し、かつ、細胞内のグルタミナーゼ活性が低下するように改変されたコリネ型細菌。

(2) 染色体上のグルタミナーゼ遺伝子が破壊されたことにより、グルタミナーゼ活性が低下した(1)のコリネ型細菌。

(3) グルタミナーゼ活性が、0.1 U/mg 菌体タンパク質以下である(1)又は(2)の細菌。

(4) 菌体タンパク質当たりのグルタミナーゼ活性がグルタミンシンターゼ活性と同じか又はそれ以下である(1)～(3)のいずれかの細菌。

(5) さらに細胞内のグルタミンシンターゼ活性が増強するように改変された(1)～(4)のいずれかの細菌。

(6) グルタミンシンターゼ活性の増強が、グルタミンシンターゼ遺伝子の発現量の増強によるものである(5)の細菌。

(7) グルタミンシンターゼ遺伝子の発現量の増強が、グルタミンシンターゼをコードする遺伝子のコピー数を高めること、又は前記細菌細胞内のグルタミンシンターゼをコードする遺伝子の発現が増強されるように同遺伝子の発現調節配列を改変することによるものである(6)の細菌。

(8) (1)～(7)のいずれかの細菌を培地に培養し、該培地中にL-グルタミンを生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とするL-グルタミンの製造法。

(9) コリネ型細菌のグルタミンシンターゼ遺伝子であって、-35領域の配列がTTGCCAであり、-10領域の配列がTATAATであるグルタミンシンターゼ遺伝子。

【0011】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0012】

(1) 本発明のコリネ型細菌

本発明において、「コリネ型細菌」とは、従来ブレヴィバクテリウム属に分類さ

れていたが、現在コリネバクテリウム属に分類された細菌も含み (Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255(1981))、またコリネバクテリウム属と非常に近縁なブレビバクテリウム属細菌を含む。このようなコリネ型細菌の例として以下のものが挙げられる。

【0013】

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム

コリネバクテリウム・アセトグルタミカム

コリネバクテリウム・アルカノリティカム

コリネバクテリウム・カルナエ

コリネバクテリウム・グルタミカム

コリネバクテリウム・リリウム

コリネバクテリウム・メラセコーラ

コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス

コリネバクテリウム・ハーキュリス

ブレビバクテリウム・ディバリカタム

ブレビバクテリウム・フラバム

ブレビバクテリウム・インマリオフィラム

ブレビバクテリウム・ラクトファーメントム

ブレビバクテリウム・ロゼウム

ブレビバクテリウム・サッカロリティカム

ブレビバクテリウム・チオゲニタリス

コリネバクテリウム・アンモニアゲネス

ブレビバクテリウム・アルバム

ブレビバクテリウム・セリヌム

ミクロバクテリウム・アンモニアフィラス

【0014】

具体的には、下記のような菌株を例示することができる。

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム ATCC13870

コリネバクテリウム・アセトグルタミカム ATCC15806

コリネバクテリウム・アルカノリティカム ATCC21511

コリネバクテリウム・カルナエ ATCC15991

コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13020, ATCC13032, ATCC13060

コリネバクテリウム・リリウム ATCC15990

コリネバクテリウム・メラセコーラ ATCC17965

コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス AJ12340(FERM BP-1539)

コリネバクテリウム・ハーキュリス ATCC13868

ブレビバクテリウム・ディバリカタム ATCC14020

ブレビバクテリウム・フラバム ATCC13826, ATCC14067, AJ12418(FERM BP-220

5)

ブレビバクテリウム・インマリオフィラム ATCC14068

ブレビバクテリウム・ラクトファーメントム ATCC13869

ブレビバクテリウム・ロゼウム ATCC13825

ブレビバクテリウム・サッカロリティカム ATCC14066

ブレビバクテリウム・チオゲニタリス ATCC19240

コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC6871、ATCC6872

ブレビバクテリウム・アルバム ATCC15111

ブレビバクテリウム・セリヌム ATCC15112

ミクロバクテリウム・アンモニアフィラス ATCC15354

【0015】

これらを手に入れるには、例えばアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションより分譲を受けることができる。すなわち、各菌株毎に対応する登録番号が付与されており、この登録番号を利用して分譲を受けることができる。各菌株に対応する登録番号はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションのカタログに記載されている。また、AJ12340株は、1987年10月27日付けで通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（現独立行政法人 産業技術総合研究所 特許微生物寄託センター）（〒305-5466 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）にFERM BP-1539の受託番号でブダペスト条約に基づいて寄託されている。また、AJ12418株は、1989年1月5日付けで通商産業省工業技術院生命工学工業

技術研究所にFERM BP-2205の受託番号でブダペスト条約に基づいて寄託されている。

【0016】

本発明において、「L-グルタミン生産能」とは、本発明のコリネ型細菌を培養したときに、培地中にL-グルタミンを蓄積する能力をいう。このL-グルタミン生産能は、コリネ型細菌の野生株の性質として有するものであってもよく、育種によって付与または増強された性質であってもよい。

【0017】

育種によってL-グルタミン生産能を付与または増強するには、6-ジアゾ-5-オキソ-ノルロイシン耐性を付与する方法（特開平3-232497）、プリンアナログ耐性および／またはメチオニンスルホキサイド耐性を付与する方法（特開昭61-202694）、 α -ケトマロン酸耐性を付与する方法（特開昭56-151495）、グルタミン酸を含有するペプチドに耐性を付与する方法（特開平2-186994）などが挙げられる。L-グルタミン生産能を有するコリネ型細菌の具体例としては、下記のような菌株が挙げられる。

ブレヴィバクテリウム・フラバムAJ11573(FERM P-5492) 特開昭56-151495公報参照
ブレヴィバクテリウム・フラバムAJ12210(FERM P-8123) 特開昭61-202694公報参照
ブレヴィバクテリウム・フラバムAJ12212(FERM P-8123) 特開昭61-202694公報参照
ブレヴィバクテリウム・フラバムAJ12418(FERM-BP2205) 特開平2-186994公報参照
ブレヴィバクテリウム・フラバムDH18(FERM P-11116) 特開平3-232497公報参照
コリネバクテリウム・メラセコラDH344(FERM P-11117) 特開平3-232497公報参照
コリネバクテリウム・グルタミカムAJ11574(FERM P-5493) 特開昭56-151495公報参照

【0018】

本発明のコリネ型細菌は、上記のようなコリネ型細菌であって、細胞内のグルタミナーゼ活性が低下するように改変された細菌である。

「グルタミナーゼ活性（以下、「GLS活性」ともいう）」とは、L-グルタミンを基質として、L-グルタミン酸を生成する酵素活性のことをいう。GLS活性は、例えば以下の方法で測定することができる。

【0019】

コリネ型細菌の粗酵素液を、Tris-HCl (pH8.0)100mM, L-グルタミン75mMを含む溶液に加えて30℃で30分または60分反応させた後、終濃度0.5%となるようにSDSを添加することで反応を停止し、生成するL-グルタミン酸を定量する。本発明においては、上記反応系にて1分間に1マイクロモルのグルタミン酸を生成するグルタミナーゼ活性を1Uと定義する。また粗酵素液のタンパク質量は、公知の方法、例えば牛血清アルブミンを標準試料としてProtein Assay (Bio-Rad)を用いて定量すればよい。以下、タンパク質1mg当たりのGLS活性を、「U/mg」として表記する。

【0020】

前記粗酵素液は、例えば以下のようにして調製する。まず、菌体を調製する為に、グルコース30g、 KH_2PO_4 1.5g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g、 $\text{VB}_1 \cdot \text{HCl}$ 100 μg 、ビオチン 3 μg 、大豆加水分解物200mg、尿素 1.5g、GD-113 0.02mlを純水1Lに含む培地 (NaOHでpH6.8に調整されている) 20mlを500mlの坂口フラスコに張り込み、115℃で10分オートクレーブ滅菌した後に該菌株を接種し、31.5℃、115rpmにてしんとう培養する。糖を完全に消費する前に培養を終了し、培養液を瞬時に冷却する。培養液を冷却遠心分離にて菌体を分離し、Tris-HCl (pH8.0)100mMで洗浄後、超音波破碎し未破碎菌体を15000gで15分間遠心分離することにより除去し粗酵素液を調製する。粗酵素液は使用する直前まで氷上におく。

【0021】

上記の方法によると、公知のL-グルタミン生産菌のGLS活性は、後述の表8に示すとおりである。

【0022】

「細胞内のグルタミナーゼ活性が低下するように改変された」とは、細胞当たりのGLS活性がコリネ型細菌の野生株又は非改変株のそれよりも低くなるように改変されたことをいう。例えば、細胞当たりのGLS分子の数が減少した場合や、GLS分子当たりのGLS活性が低下した場合などが該当する。尚、「低下」には、完全に消失した場合も含まれる。また、比較対象となるコリネ型細菌の野生株又は非改変株としては、例えばブレヴィバクテリウム・フラバム ATCC14067が挙げられ

る。GLS活性が弱化された結果、培地中のL-グルタミン蓄積量が上昇するという効果や、L-グルタミン酸の副生が減少するという効果がある。

【0023】

本発明のコリネ型細菌は、野生株又は非改変株よりもGLS活性が低下していればよいが、好ましくは、前述の測定系にてその活性を測定したときに、GLS活性が0.1U/mg以下、好ましくは0.02U/mg以下、より好ましくは0.01U/mg以下に弱化された株である。しかし、本発明の範囲を0.01U/mg以下に限定するものではない。

【0024】

コリネ型細菌のGLSをコードする遺伝子は明らかにされていないが、本発明者らは、既に公開されているコリネバクテリウム・グルタミカム（*Corynebacterium glutamicum*）のゲノム配列上に、リゾビウム属細菌のGLSをコードする遺伝子（*Biochim Biophys Acta*, 1999 Mar 19;1444(3):451-6）と相同性のある遺伝子が存在することを見出した。その塩基配列に基づいて作製したプライマー、例えば配列番号5および6に示すプライマーを用いて、コリネ型細菌の染色体DNAを鋳型とするPCR法（PCR: polymerase chain reaction; White, T.J. et al., *Trends Genet.* 5, 185 (1989) 参照）によって、gls遺伝子を取得することができる。他の微生物のGLSをコードする遺伝子も、同様にして取得され得る。こうして取得したブレヴィバクテリウム・フラバム（*Brevibacterium flavum*）ATCC14067株のGLS遺伝子を配列番号1に、そのアミノ酸配列を配列番号2に示す。

【0025】

染色体DNAは、DNA供与体である細菌から、例えば、斎藤、三浦の方法（H. Saito and K. Miura, *Biochem. Biophys. Acta*, 72, 619 (1963)、*生物学実験書*、日本生物工学会編、97～98頁、培風館、1992年参照）等により調製することができる。

【0026】

コリネ型細菌のGLS活性を低下させるには、例えば、コリネ型細菌を紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン（NTG）もしくは亜硝酸等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理し、GLS活性が低下し

た変異株を選択する方法が挙げられる。また、GLS活性が低下したコリネ型細菌は、変異処理の他に、GLSをコードする遺伝子 (gls) の部分配列を欠失し、正常に機能するGLSを産生しないように改変したgls遺伝子 (欠失型gls) を含むDNAでコリネ型細菌を形質転換し、欠失型glsと染色体上のglsとの間で組換えを起こさせることにより、染色体上のglsを破壊することができる。このような相同組換えを利用した遺伝子置換による遺伝子破壊は既に確立しており、直鎖DNAを用いる方法や温度感受性複製起点を含むプラスミドを用いる方法などがある。

【0027】

GLS活性の弱化は、gls遺伝子のプロモーター等の発現調節配列を微弱なものに置換することによっても達成される (特開 2000-818935)。また、発現調節変異と上記のglsの破壊と組み合わせてもよい。

【0028】

欠失型glsを、宿主染色体上のglsと置換するには、例えば以下のようにすればよい。温度感受性複製起点と欠失型glsとクロラムフェニコール等の薬剤に耐性を示すマーカー遺伝子とを挿入して組換えDNAを調製し、この組換えDNAでコリネ型細菌を形質転換し、温度感受性複製起点が機能しない温度で形質転換株を培養し、続いてこれを薬剤を含む培地で培養することにより、組換えDNAが染色体DNAに組み込まれた形質転換株が得られる。

【0029】

上記のように調製した組換えDNAをコリネ型細菌に導入するには、これまでに報告されている形質転換法に従って行えばよい。例えば、エシェリヒア・コリ K-12 について報告されているような、受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方法 (Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159 (1970)) があり、バチルス・ズブチリスについて報告されているような、増殖段階の細胞からコンピテントセルを調製してDNAを導入する方法 (Duncan, C.H., Wilson, G.A. and Young, F.E., Gene, 1, 153 (1977)) がある。あるいは、バチルス・ズブチリス、放線菌類及び酵母について知られているような、DNA受容菌の細胞を、組換えDNAを容易に取り込むプロトプラストまたはスフェロプラストの状態にして組換えDNAをDNA受容菌に導入する方法 (Chang, S. and C

hoen, S. N., Molec. Gen. Genet., 168, 111 (1979); Bibb, M. J., Ward, J. M. and Hopwood, O. A., Nature, 274, 398 (1978); Hinnen, A., Hicks, J. B. and Fink, G. R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 1929 (1978)) も応用できる。また、コリネ型細菌の形質転換は、電気パルス法 (杉本ら、特開平2-207791号公報) によっても行うことができる。

【0030】

コリネ型細菌の温度感受性プラスミドとしては、p48K及びpSFKT2 (以上、特開2000-262288号公報参照)、pHSC4 (フランス特許公開1992年2667875号公報、特開平5-7491号公報参照) 等が挙げられる。これらのプラスミドは、コリネ型細菌中で少なくとも25℃では自律複製することができるが、37℃では自律複製できない。pHSC4を保持するエシェリヒア・コリAJ12571は、1990年10月11日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (現独立行政法人 産業技術総合研究所 特許微生物寄託センター) (〒305-5466 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1

中央第6) に受託番号FERM P-11763として寄託され、1991年8月26日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-3524の受託番号で寄託されている。また、後記実施例のようにコリネ型細菌内で自律複製できないプラスミドを用いてコリネ型細菌を形質転換し、該プラスミドを相同組換えによりコリネ型細菌の染色体に挿入することも可能である。

【0031】

こうして染色体に組換えDNAが組み込まれた株は、染色体上にもともと存在するgls配列との組換えを起こし、染色体glsと欠失型glsとの融合遺伝子2個が組換えDNAの他の部分 (ベクター部分、温度感受性複製起点及び薬剤耐性マーカー) を挟んだ状態で染色体に挿入されている。したがって、この状態では正常なglsが優性であるので、形質転換株は正常なglsを発現する。

【0032】

次に、染色体DNA上に欠失型glsのみを残すために、2個のglsの組換えにより1コピーのglsを、ベクター部分 (温度感受性複製起点及び薬剤耐性マーカーを含む) とともに染色体DNAから脱落させる。その際、正常なglsが染色体DNA上に残され、欠失型glsが切り出される場合と、反対に欠失型glsが染色体D

NA上に残され、正常なglsが切り出される場合がある。いずれの場合も、温度感受性複製起点が機能する温度で培養すれば、切り出されたDNAはプラスミド状態で細胞内に保持される。次に、温度感受性複製起点が機能しない温度で培養すると、プラスミド上のglsは、プラスミドとともに細胞から脱落する。そして、PCRまたはサザンハイブリダイゼーション等により、染色体上に欠失型glsが残った株を選択することによって、glsが破壊された株を取得することができる。

【0033】

遺伝子破壊に用いる欠失型gls遺伝子は、目的とするコリネ型細菌の染色体DNA上のgls遺伝子と相同組換えを起こす程度の相同性を有していればよい。このような相同性は、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、特に好ましくは90%以上である。また、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得るDNA同士であれば、相同組換えは起こり得る。「ストリンジェントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1%SDS、好ましくは、0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度でハイブリダイズする条件が挙げられる。

【0034】

コリネ型細菌の細胞内において、L-グルタミンはグルタミンシンターゼ（以下、「GS」ともいう）によって合成され、生成したL-グルタミンはGLSによって分解されることが推定される。すなわち、効率よくL-グルタミンを生産するには、GS活性を高く、反対にGLS活性は低く保つことが重要であると本発明者は考えた。しかしながら、コリネ型細菌の野生株においては、GS活性はGLS活性に比べて著しく低い。L-グルタミン生成時における細胞内のL-グルタミン生成と分解の平衡は、これら酵素の比活性のみではなく、酵素それぞれのKm値や、細胞内の基質濃度によって変化するが、比活性が重要な因子であることは言うまでもない。

【0035】

例えば実施例4に記載にしたように、GLS活性低下変異株では、そのGLS残存活

性がGS活性の6割程度に抑制されることにより収率の向上が認められる。

GS活性は、例えば下記のようにして測定することができる。

【0036】

コリネ型細菌の粗酵素液を、イミダゾール-HCl (pH7.0) 100mM, KCl 90mM, NH_4Cl 0.1mM, MnCl_2 1mM, ホスホエノールピルビン酸 1mM, NADH 0.3mM, ラクテートデヒドロゲナーゼ 10U, ピルビン酸キナーゼ 25U, ATP 1mM, MSG (グルタミン酸ナトリウム) 10mMを含む溶液に加え、30℃における340nmの吸光度変化を測定することによってGSの反応を定量できる。ブランクの測定には、上記反応液よりMSGを除いたものを用いる。粗酵素液のタンパク質濃度は、牛血清アルブミンを標準試料として、Protein Assay (Bio-Rad) を用いて定量する。本発明においては、上記反応系にて1分間に1マイクロモルのNADを生成する酵素量を1Uと定義する。以下、タンパク質1mg当たりのGS活性を、「U/mg」として表記する。

【0037】

前記粗酵素液は、例えば以下のようにして調製する。培養液より遠心分離により菌体を分離し、イミダゾール-HCl (pH7.0) 100mM (KCl 90mMを含む溶液) で洗浄後、超音波破碎し、未破碎菌体を遠心分離で除去し、さらに超遠心分離により不溶性画分を除くことにより粗酵素液を調製する。

【0038】

本発明のコリネ型細菌を用いてL-グルタミンを効率よく生産するには、GLS活性の弱化と同時にグルタミンシンテターゼ活性が高められた菌株を用いるのが好ましい。

【0039】

「グルタミンシンテターゼ活性が増強された」とは、細胞当たりのGS活性が野生型のコリネ型細菌のそれよりも高くなったことをいう。例えば、細胞当たりのGS分子の数が増加した場合や、GS分子当たりのGS活性が上昇した場合などが該当する。また、比較対象となる野生型のコリネ型細菌とは、例えばブレヴィバクテリウム・フラバム ATCC14067である。GS活性が増強された結果、培地中のL-グルタミン蓄積量が上昇するという効果や、L-グルタミン酸の副生が減少するという効果がある。

【0040】

本発明のコリネ型細菌は、野生株又は非改変株よりもGLS活性が低下し、かつ、GS活性が増強されていればよいが、好ましくは、菌体タンパク質当たりのGLS活性がGS活性と同じか又はそれ以下、より好ましくはGLS活性がGS活性の $1/2$ 以下の細菌である。本発明において、菌体タンパク質当たりのGLS活性及びGS活性とは、前記の測定法及び定義による活性を意味する。

【0041】

コリネ型細菌細胞内のGS活性の増強は、GSをコードする遺伝子のコピー数を高めることによって達成される。例えば、GSをコードする遺伝子断片を、該細菌で機能するベクター、好ましくはマルチコピー型のベクターと連結して組換えDNAを作製し、これをL-グルタミン生産能を有する宿主に導入して形質転換すればよい。また、野生型のコリネ型細菌に上記組換えDNAを導入して形質転換株を得、その後当該形質転換株にL-グルタミン生産能を付与してもよい。

【0042】

GS遺伝子は、コリネ型細菌由来の遺伝子およびエシェリヒア属細菌等の他の生物由来の遺伝子のいずれも使用することができる。このうち、発現の容易さの観点からは、コリネ型細菌由来の遺伝子が好ましい。

【0043】

コリネ型細菌のGSをコードする遺伝子として、既にglnAが明らかにされている (FEMS Microbiology Letters, 154, 81-88, 1997) ので、その塩基配列に基づいて作製したプライマー、例えば配列番号19および20に示すプライマーを用いて、コリネ型細菌の染色体DNAを鋳型とするPCR法によって、GS遺伝子を取得することができる。他の微生物のGSをコードする遺伝子も、同様にして取得され得る。プレビバクテリウム・フラバムATCC14067株のglnA遺伝子の塩基配列を配列番号3に、そのアミノ酸配列を配列番号4に示す。

【0044】

GSをコードする遺伝子としては、野生型glnA遺伝子の他に、L-グルタミン酸とアンモニウムイオンからL-グルタミンを生成する反応を触媒する活性を実質的に損なわないような1若しくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加

、又は逆位を含むアミノ酸配列をコードするものであってもよい。ここで、「数個」とは、アミノ酸残基のタンパク質の立体構造における位置や種類によっても異なるが、好ましくは2から30個、より好ましくは2から20個、特に好ましくは2から10個である。

【0045】

上記のようなGSと実質的に同一のタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号3の塩基番号874～2307からなる塩基配列又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつGSと同様の活性を有するタンパク質をコードするDNAが挙げられる。「ストリンジェントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば50%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1%SDS、好ましくは、0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度でハイブリダイズする条件が挙げられる。

【0046】

コリネ型細菌で機能するベクターとは、例えばコリネ型細菌で自律複製できるプラスミドである。具体的に例示すれば、以下のものが挙げられる。

pAM330 特開昭58-67699号公報参照

pHM1519 特開昭58-77895号公報参照

pSFK6 特開2000-262288号公報参照

【0047】

また、これらのベクターからコリネ型細菌中でプラスミドを自律複製可能にする能力を持つDNA断片を取り出し、前記エシェリヒア・コリ用のベクターに挿入すると、エシェリヒア・コリ及びコリネ型細菌の両方で自律複製可能ないわゆるシャトルベクターとして使用することができる。

【0048】

このようなシャトルベクターとしては、以下のものが挙げられる。尚、それぞ

れのベクターを保持する微生物及び国際寄託機関の受託番号をカッコ内に示した。
。

pAJ655 エシェリヒア・コリアJ11882(FERM BP-136)

コリネバクテリウム・ゲルタミクムSR8201(ATCC39135)

pAJ1844 エシェリヒア・コリアJ11883(FERM BP-137)

コリネバクテリウム・ゲルタミクムSR8202(ATCC39136)

pAJ611 エシェリヒア・コリアJ11884(FERM BP-138)

pAJ3148 コリネバクテリウム・ゲルタミクムSR8203(ATCC39137)

pAJ440 ハチルス・スプチャスAJ11901(FERM BP-140)

pHC4 エシェリヒア・コリアJ12617(FERM BP-3532)

【0049】

これらのベクターは、寄託微生物から次のようにして得られる。対数増殖期に集められた細胞をリゾチーム及びSDSを用いて溶菌し、30000×gで遠心分離して溶解物から得た上澄液にポリエチレングリコールを添加し、セシウムクロライド-エチジウムブロマイド平衡密度勾配遠心分離により分別精製する。

【0050】

GS遺伝子のコピー数を高めることは、GS遺伝子をコリネ型細菌の染色体DNA上に多コピー存在させることによって達成できる。コリネ型細菌の染色体DNA上にGS遺伝子を多コピーで導入するには、染色体DNA上に多コピー存在する配列を標的に利用して相同組換えにより行う。染色体DNA上に多コピー存在する配列としては、レペティティブDNA、転移因子の端部に存在するインバーテッド・リピートが利用できる。あるいは、特開平2-109985号公報に開示されているように、GS遺伝子をトランスポゾンに搭載してこれを転移させて染色体DNA上に多コピー導入することも可能である。

【0051】

GS活性の増強は、上記の遺伝子増幅による以外に、染色体DNA上またはプラスミド上のGS遺伝子のプロモーター等の発現調節配列を強力なものに置換することによっても達成される。例えば、lacプロモーター、trpプロモーター、trcプロモーター等が強力なプロモーターとして知られている。また、国際公開W000/189

35に開示されているように、GS遺伝子のプロモーター領域に数塩基の塩基置換を導入し、より強力なものに改変することも可能である。これらのプロモーター置換または改変によりGS遺伝子の発現が強化され、GS活性が増強される。これら発現調節配列の改変は、GS遺伝子のコピー数を高めることと組み合わせてもよい。

【0052】

例えば、GS遺伝子として、コリネ型細菌のglnA遺伝子の転写開始点はAntonらによってプロモーター領域も含めて明らかにされている (FEMS Microbiology Letters, 205, 361-367, 2001)。例えば、この報文の図3Cに明らかにされている-10領域の配列をTATAATに、-35領域の配列をTTGCCAに置換することにより、GS活性が増強される。ただし、本発明におけるGS遺伝子の-35領域とは、前述の報文に記されている-35領域よりも3bp下流側すなわち転写開始点側に位置している領域 (配列番号3の塩基番号727~732) のことであり、-10領域とは前述の報文に記されている部位と同一の領域 (配列番号3の塩基番号751~756) のことをいう。上記のようなGS遺伝子の-35領域及び-10領域の改変は、例えば部位特異的変異法により行うことができる。

-10領域及び-35領域の配列を改変するGS遺伝子としては、コリネ型細菌のglnA遺伝子、例えば配列番号3の配列を有する遺伝子が挙げられる。尚、コードされるタンパク質は、L-グルタミン酸とアンモニウムイオンからL-グルタミンを生成する反応を触媒する活性を実質的に損なわないような1若しくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列を有するものであってもよい。

【0053】

GS活性の増強は、上記のようなGS遺伝子の発現量を増強する以外に、細胞内のGSのアデニリル化による活性調節が解除されることによっても達成される (EP1229121A2)。

【0054】

また、本発明のコリネ型細菌は、GLS活性の低下およびGS活性の増強以外に、L-グルタミン生合成を触媒する酵素の活性が増強されていてもよい。例えばグルタミン生合成を触媒する酵素としては、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ、アコ

ニット酸ヒドラターゼ、クエン酸シンターゼ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ、ピルビン酸カルボキシラーゼ、ピルビン酸キナーゼ、ホスホフルクトキナーゼ等がある。

【0055】

さらに、L-グルタミンの生合成経路から分岐してL-グルタミン以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素の活性が低下または欠損していてもよい。このような反応を触媒する酵素としては、イソクエン酸リアーゼ、 α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ、グルタミン酸シンターゼ等が挙げられる。

【0056】

(2) 本発明の微生物を用いたL-グルタミンの生産

上記のようにして得られるコリネ型細菌を培地で培養し、該培地中にL-グルタミンを生成蓄積せしめ、該培地からL-グルタミンを採取することにより、L-グルタミンを効率よく製造することができ、かつ、L-グルタミン酸の副生を抑制することができる。

【0057】

本発明のコリネ型細菌を用いてL-グルタミンを生産するには、炭素源、窒素源、無機塩類、その他必要に応じてアミノ酸、ビタミン等の有機微量栄養素を含有する通常の培地を用いて常法により行うことができる。合成培地または天然培地のいずれも使用可能である。培地に使用される炭素源および窒素源は培養する菌株の利用可能であるものならばいずれの種類を用いてもよい。

【0058】

炭素源としては、グルコース、グリセロール、フラクトース、スクロース、マルトース、マンノース、ガラクトース、澱粉加水分解物、糖蜜等の糖類が使用され、その他、酢酸、クエン酸等の有機酸、エタノール等のアルコール類も単独あるいは他の炭素源と併用して用いられる。

【0059】

窒素源としては、アンモニア、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、塩化アンモニウム、りん酸アンモニウム、酢酸アンモニウム等のアンモニウム塩または硝酸塩等が使用される。

【0060】

有機微量栄養素としては、アミノ酸、ビタミン、脂肪酸、核酸、更にこれらのものを含有するペプトン、カザミノ酸、酵母エキス、大豆タンパク分解物等が使用され、生育にアミノ酸などを要求する栄養要求性変異株を使用する場合には要求される栄養素を補添することが好ましい。

【0061】

無機塩類としては、りん酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、鉄塩、マンガン塩等が使用される。

培養は、発酵温度20～45℃、pHを5～9に制御し、通気培養を行う。培養中にpHが下がる場合には、炭酸カルシウムを加えるか、アンモニアガス等のアルカリで中和する。かくして10時間～120時間程度培養することにより、培養液中に著量のL-グルタミンが蓄積される。

【0062】

培養終了後の培養液からL-グルタミンを採取する方法は、公知の回収方法に従って行えばよい。例えば、培養液から菌体を除去した後に、濃縮晶析することによって採取される。

【0063】**【実施例】**

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

【0064】**【実施例1】 gls増幅株の構築****(1) コリネ型細菌のグルタミナーゼ活性の測定**

コリネ型細菌では、L-グルタミンを分解してL-グルタミン酸を生成する酵素グルタミナーゼの存在は明確に知られていなかった。そこで本発明者らは、コリネ型細菌にグルタミナーゼ活性が存在するかを検証した。

【0065】

ブレビバクテリウム・フラバムATCC14067株をグルコース30g、KH₂PO₄ 1.5g、MgSO₄・7H₂O 0.4g、FeSO₄・7H₂O 0.01g、VB₁・HCl100μg、ビオチン 3μg、大豆加水分解物200mg、尿素 1.5g、GD-113 0.02mlを純水1Lに含む培地（KOHでpH7.0に

調整されている) に接種し、31.5℃にてしんとう培養した。培養液より遠心分離にて菌体を分離し、100mM Tris-HCl (pH8.0) で洗浄後、超音波破碎し、未破碎菌体を遠心分離で除去することにより粗酵素液を調製した。粗酵素液のタンパク質濃度は牛血清アルブミンを標準試料として、Protein Assay (Bio-Rad) を用いて定量した。

【0066】

グルタミナーゼ活性は、Tris-HCl (pH8.0) 100mM, L-グルタミン75mMを含む溶液に粗酵素液を加えて30℃で30分または60分反応させ、終濃度0.5%となるようにSDSを添加することで反応を停止した後に、L-グルタミン酸生成量を定量することによって測定した。その結果、表1に示すように、ブレビバクテリウム・フラバムではグルタミナーゼ活性を示す酵素が存在することが示された。

【0067】

【表1】

表1 コリネ型細菌のGLS活性

菌株	ATCC14067
GLS(U/mg)	0.25

【0068】

(2) グルタミナーゼ遺伝子のクローニング

L-グルタミンは、核酸、アミノ酸などの生合成において、NH₃の供与体となることが知られており、例えばカルバモイルリン酸合成酵素のsmallサブユニットはグルタミナーゼ活性を示すことが知られている。一方で、核酸・アミノ酸生合成とは無関係にグルタミナーゼ活性を示す遺伝子として、近年*Rhizobium etli*でグルタミナーゼをコードする遺伝子glsAがクローニングされている (Biochim. Biophys. Acta, 1444(3): 451-6, 1999)。そこで、本発明者らはglsAの相同遺伝子をコリネ型細菌の遺伝子群より検索した結果、配列番号1に示す塩基配列がglsAと相同性が高いことを見出した(以下、配列番号1の塩基配列を有する遺

伝子を「gls」とする)。そこで、コリネ型細菌中でこの遺伝子を増幅し、グルタミナーゼ活性の向上が認められるかを検証するために、この遺伝子のクローニングを行なった。

【0069】

配列番号5および6に示すプライマーを合成し、ブレヴィバクテリウム・フラバム ATCC14067株の染色体DNAを鋳型にして、PCR法により目的配列を増幅した。なお、配列番号5、6はそれぞれ配列番号1の塩基番号1~20, 2100~2081に該当する。ブレヴィバクテリウム・フラバム ATCC14067株の染色体DNAの調製は、Bacterial Genome DNA Purification Kit (Advanced Genetic Technologies Corp.) を用いて行った。また、PCR反応は、Pyrobest DNA Polymerase (宝酒造) を用い、変性94℃ 30秒、会合55℃ 15秒、伸長72℃ 3分の条件で30サイクル行った。

【0070】

生成したPCR産物を常法により精製後、ブランディングキット (宝酒造) を用いて平滑末端化した。平滑末端化したPCR産物は、コリネ型細菌とエシェリヒア・コリのシャトルベクターであるpHMK2をSmaI処理した断片とライゲーションキット (宝酒造) を用いて連結した後、エシェリヒア・コリJM109のコンピテントセル (宝酒造) を用いて形質転換を行い、IPTG 10 μ g/ml, X-Gal 40 μ g/mlおよびカナマイシン25 μ g/mlを含むL培地に塗布し、一晚培養した。その後、出現した白色のコロニーを釣り上げ、単コロニー分離し、形質転換体を得た。

【0071】

形質転換体からアルカリ法によりプラスミドを調製した後、ベクターに目的のPCR断片が挿入されているプラスミドをpHMKGLS5と名付けた。なお、pHMK2は、E. coliのクローニングベクターpK1 (特開2000-262288) のBsaAI部位に、コリネ型細菌で自律複製可能なプラスミドpHM1519 (Agric. Biol. Chem., 48, 2901-2903(1984)) 由来の複製起点を持つプラスミドpHK4 (特開平5-7491公報参照) を制限酵素BamHIおよびSmaIで消化して、複製起点を含む遺伝子断片を取得し、得られた断片をDNA平滑末端化キット (宝酒造) を用い平滑末端化した後に、挿入したプラスミドである。pHMKGLS5の構築過程を図1に示した。

【0072】

(3) glsの過剰発現株の構築

上記(2)で取得したpHMGLS5をコリネ型細菌に導入し、gls増幅株を取得した。具体的には、ブレビバクテリウム・フラバムATCC14067株を電気パルス法(特開平2-207791号公報参照)によりpHMGLS5を用いて形質転換し、カナマイシン25 μ g/mlを含むCM2G培地(ポリペプトン10g/L, イーストエキストラクト10g/L, NaCl 5g/L, グルコース 1g/L pH7.0(KOH))に塗布し、31.5℃にて2晩培養し、出現したコロニーを単離して形質転換体とし、2247/pHMKGLS5と名付けた。また、併行してpHMK2の導入株も構築し、得られた形質転換体を2247/pHMK2とした。これらの菌株を(1)記載の方法で培養し、GLS活性を測定した。その結果、pHMGLS5導入株ではグルタミナーゼ活性が上昇していることが確認された(表2)。なお、形質転換株のプラスミド保持率は100%であった。

【0073】

【表2】

表2 GLS増幅株のGLS活性

菌株	ATCC14067/pHMK2	ATCC14067/pHMKGLS5
GLS(U/mg)	0.19	0.33

【0074】

【実施例2】 gls欠損株の構築

(1) gls破壊用プラスミドの構築

コリネ型細菌のグルタミナーゼをコードする遺伝子が、gls遺伝子の他にも存在しているか確認する為に、gls欠損株を構築した。具体的な方法を下記に記す。

【0075】

まずブレビバクテリウム・フラバムATCC14067株の染色体DNAを鋳型として、配列番号5と7の合成DNAをプライマーとしてPCRを行い、gls遺伝子N末端側の増幅産物を得た。一方、gls遺伝子C末端側の増幅産物を得るために、ブレビバクテリ

ウム・フラバムATCC14067株の染色体DNAを鋳型として、配列番号6と8の合成DNAをプライマーとしてPCRを行った。配列番号7と8は部分的に相補的である。なお、配列番号7、8、9、10はそれぞれ配列番号1の塩基番号1245~985, 983~1245, 414~438, 1869~1845に該当し、かつ配列番号7、8はいずれも配列番号1の塩基番号1003~1230の塩基を欠失している。PCR反応は、Z-Taq (宝酒造) を用い、変性94℃ 30秒、会合55℃ 15秒、伸長72℃ 30秒の条件で30サイクル行った。

【0076】

次に、内部配列を欠失したgls遺伝子断片を得るために、上記gls N末側およびC末側の遺伝子産物をそれぞれほぼ等モルとなるように混合し、これを鋳型として配列番号9と10の合成DNAをプライマーとしてPCRを行い、変異導入されたgls遺伝子増幅産物を得た。PCR反応は、Z-Taq (宝酒造) を用い、変性94℃ 30秒、会合55℃ 15秒、伸長72℃ 30秒の条件で30サイクル行った。このgls遺伝子産物は、配列番号2のアミノ酸配列において、110から185番目のアミノ酸を欠失することとなる。

【0077】

生成したPCR産物を常法により精製後SmaIで消化し、pNELのSmaI部位に挿入した。このDNAを用いて、エシェリヒア・コリDH5 α のコンピテントセル (宝酒造) を形質転換し、X-Gal 40 μ g/mlおよびカナマイシン25 μ g/mlを含むL培地に塗布し、一晚培養した。その後、出現した青色のコロニーを釣り上げ、単コロニー分離し、形質転換体を得た。得られた形質転換体よりプラスミドを抽出し、目的のPCR産物が挿入されていたものをpNEL Δ glsとした。なお、pNELは、pNEOL(WO 00/18935参照)を鋳型として、配列番号11、12に示す合成DNAをプライマーとしてPCRを行い、SmaI処理後にセルフライゲーションして得られたプラスミドであり、コリネ型細菌の細胞内で自律複製可能とする領域を含まない。PCR反応は、Pyrobest DNA Polymerase (宝酒造) を用い、変性98℃ 20秒、会合・伸長68℃ 6分の条件で30サイクル行っている。pNELの構築過程を図2に、pNEL Δ glsの構築過程を図3に示した。

【0078】

(2) gls欠損株の構築

上記(1)で得られたpNEL Δ GLSは、コリネ型細菌の細胞内で自律複製可能とする領域を含まないため、本プラスミドでコリネ型細菌を形質転換した場合、極めて低頻度であるが本プラスミドが相同組換えにより染色体に組み込まれた株が形質転換体として出現する。ブレヴィバクテリウム・フラバムATCC14067を電気パルス法により高濃度のプラスミドpNEL Δ glsを用いて形質転換し、カナマイシン25 μ g/mlを含むCM2G培地(ポリペプトン10g/L, イーストエキストラクト10g/L, NaCl 5g/L, グルコース 1g/L pH7.0(KOH))に塗布し、31.5℃にて2晩培養し、出現したコロニーを単離して形質転換体とした。この形質転換体は、X-Gal 40 μ g/mlを含むCM2Gプレート上で青色のコロニーを形成する。次に、これらの形質転換体をカナマイシンを含まないCM2G培地にて継代培養し適当に希釈した後、X-Gal 40 μ g/mlを含むCM2Gプレートに塗布した。出現した多数のコロニーの中から、白色のコロニーを選択し、かつカナマイシン(Km)感受性を示す株を選択した。

【0079】

これらKm感受性株の染色体DNAを鋳型として、配列番号5と6の合成DNAをプライマーとしてPCRを行い、ATCC14067の染色体DNAを鋳型にしたものよりもPCR産物の大きさが小さいものをgls欠損株として以降の実験に使用した(以下、2247 Δ glsと略す)。

【0080】

(3) 2247 Δ glsへのglsプラスミドの導入

上記(2)で得られた2247 Δ gls株に、実施例1(2)記載のプラスミドpGLS5を電気パルス法にて導入し、カナマイシン耐性を指標に形質転換体を取得した。得られた形質転換体を2247 Δ gls/pGLS5と名付けた。また、併行してpHMK2の導入も実施し、得られた形質転換体を2247 Δ gls/pHMK2とした。

【0081】

(4) gls欠損株のGLS活性測定

ブレヴィバクテリウム・フラバムATCC14067、2247 Δ gls、およびそのpHMK2, pHMKGLS導入株を実施例1(1)記載の方法でGLS活性を測定した結果を表3に示す。2247 Δ glsではL-グルタミンの分解活性がほとんど消失していることが確認

できた。また、分解活性の消失は、pHMKGLS5の導入で相補された。したがって、コリネ型細菌のグルタミナーゼ活性を担っている主要な遺伝子はglsであると推定された。

【0082】

【表3】

表3 GLS欠損株およびプラスミドによる相補株のGLS活性

菌株	2247 Δ gls	2247 Δ gls/pHMK2	2247 Δ gls/pHMKGLS5
GLS (U/mg)	0.003	0.000	0.19

【0083】

【実施例3】 gls欠損株によるL-グルタミンの生産

(1) gls欠損株の培養評価

ブレヴィバクテリウム・フラバムATCC14067株および2247 Δ gls株を用いてL-グルタミン生産のための培養を以下のように行った。CM2Gプレート培地にて培養し得たATCC14067株および2247 Δ gls株の菌体を、グルコース100g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60gまたは40g、 KH_2PO_4 2.5g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g、 $\text{VB}_1 \cdot \text{HCl}$ 1350 μg 、ビオチン 4 μg 、大豆加水分解物200mg、 CaCO_3 50gを純水1Lに含む培地 (NaOHでpH6.8に調整されている) に接種し、31.5℃にて培地中の糖が消費されるまでしんとう培養した。

【0084】

培養終了後、培養液中のL-グルタミン蓄積量は、培養液を適当に希釈した後、液体クロマトグラフィーにより分析した。カラムはCAPCELL PAK C18 (資生堂) を用い、サンプルは0.095%りん酸、3.3mMヘプタンスルホン酸、5%アセトニトリルを蒸留水1Lに含む溶離液で溶出し、210nmの吸光度の変化によりL-グルタミン蓄積量を分析した。また、L-グルタミン酸の蓄積量は、培養液を適当に希釈後、バイオテックアナライザーAS210 (旭化成) にて分析した。このときの結果を表4 (硫安60g/L)、表5 (硫安40g/L) に示した。

【0085】

2247 Δ gls株では、いずれの条件においても、その親株のATCC14067株に比べて、収率で約3%の向上が認められた。これらの結果から、L-グルタミンの生産においてGLS活性の消失または低下が有効であることが示された。

【0086】

【表4】

表4 GLS活性低下株によるL-グルタミン生産-1

菌株	OD620(X101)	Gln(g/L)	Glu(g/L)	Gln収率(%)
ATCC14067	0.398	9.9	33.4	9.7
2247 Δ gls	0.427	13.2	30.0	12.8

【0087】

【表5】

表5 GLS活性低下株によるL-グルタミン生産-2

菌株	OD620(X101)	Gln(g/L)	Glu(g/L)	Gln収率(%)
ATCC14067	0.489	6.8	42.6	6.4
2247 Δ gls	0.492	10.1	37.6	9.5

【0088】

【実施例4】 gls欠損・GS活性増強株の構築

(1) 発現が増強されたGS遺伝子を持つプラスミドの構築

コリネ型細菌のGS遺伝子の塩基配列は既に明らかにされている (Genbank Accession No. Y13221)。この配列を参考に、発現が増強されたGS遺伝子 (強化型GS遺伝子) を構築した。具体的な方法を以下に示す。まず、ブレヴィバクテリウム・フラバム ATCC14067株の染色体DNAを鋳型とし、配列番号13、18のDNAをプラ

イマーとしてN末端側の一次PCRを行い、配列番号15、17のDNAをプライマーとしてC末端側の一次PCRを行った。なお、配列番号13、14、15、16、17、18は、それぞれGenbank Accession No. Y13221の塩基番号487~507, 523~549, 1798~1775, 1770~1745, 1118~1169, 1169~1118に該当する。配列番号17と18は相補的である。PCR反応は、Pyrobest DNA polymerase (宝酒造) を用い、変性94℃ 30秒、会合55℃ 15秒、伸長72℃ 1分の条件で30サイクル行った。

【0089】

次に、強化型GS遺伝子断片を得るために、上記 GS遺伝子の上流側および下流側の増幅産物をそれぞれほぼ等モルとなるように混合し、これを鋳型として配列番号14と16の合成DNAをプライマーとしてPCRを行い、目的の変異が導入されたGS遺伝子増幅産物を得た。PCR反応は、Pyrobest DNA polymerase (宝酒造) を用い、変性94℃ 30秒、会合55℃ 15秒、伸長72℃ 2分の条件で30サイクル行った。

【0090】

次にPCR産物を常法により精製後SmaIで消化し、pNELのSmaI部位に挿入した。このDNAを用いて、エシェリヒア・コリDH5 α のコンピテントセル (宝酒造) を形質転換し、X-Gal 40 μ g/mlおよびカナマイシン25 μ g/mlを含むL培地に塗布し、一晩培養した。その後、出現した青色のコロニーを釣り上げ、単コロニー分離し、形質転換体を得た。得られた形質転換体よりプラスミドを抽出し、glnA発現制御領域の配列決定し、目的の変異が導入されていたものをpNELglnA14とした。pNELglnA14の構築過程を図4に示した。こうして得られたpNELglnA14にクローニングされているglnA遺伝子断片は、FEMS Microbiology Letters 205(2001)361-367に記載されているGS遺伝子の-35領域よりも3bp下流の領域の配列 (ATTATA) がTATAATに、および-10領域の配列 (TTTTGA) がTTGCCAに置換されている。

【0091】

(2) GS活性増強株の構築

上記(1)で得られたpNELglnA14はコリネ型細菌の細胞内で自律複製可能とする領域を含まないため、本プラスミドでコリネ型細菌を形質転換した場合、極め

て低頻度であるが本プラスミドが相同組換えにより染色体に組み込まれた株が形質転換体として出現する。ブレビバクテリウム・フラバム2247 Δ gls株を電気パルス法により高濃度のプラスミドpNEL Δ glnA14を用いて形質転換し、カナマイシン25 μ g/mlを含むCM2G培地（ポリペプトン10g/L, イーストエクストラクト10g/L, NaCl 5g/L, グルコース 1g/L pH7.0(KOH)）に塗布し、31.5℃にて2晩培養し、出現したコロニーを単離して形質転換体とした。この形質転換体は、X-Gal 40 μ g/mlを含むCM2Gプレート上で青色のコロニーを形成する。次に、これらの形質転換体をカナマイシン（Km）を含まないCM2G培地にて継代培養し適当に希釈した後、X-Gal 40 μ g/mlを含むCM2Gプレートに塗布した。出現した多数のコロニーの中から、白色のコロニーを選択し、かつカナマイシン感受性を示す株を選択した。

【0092】

これらKm感受性株の染色体DNAを鋳型として、配列番号14と16の合成DNAをプライマーとしてPCRを行い、発現制御領域の配列を決定した。Km感受性株のうち、発現制御領域に目的の変異が導入されていたものを、2247 Δ gls glnA14として以降の実験に使用した。

【0093】

(3) GS活性の測定

ブレビバクテリウム・フラバムATCC14067株を、グルコース30g、KH₂PO₄ 1.5g、MgSO₄·7H₂O 0.4g、FeSO₄·7H₂O 0.01g、VB₁·HCl100 μ g、ビオチン 3 μ g、大豆加水分解物350mg、尿素 3.0g、GD-113 0.02mlを純水1Lに含む培地（KOHでpH7.0に調整されている）に接種し、31.5℃にてしんとう培養した。GS活性は、Journal of Fermentation and Bioengineering, Vol.70, No.3, 182-184, 1990に記載の方法を参考とし、イミダゾール-HCl(pH7.0)100mM, KCl 90mM, NH₄Cl 0.1mM, MnCl₂ 1mM, ホスホエノールピルビン酸1mM, NADH 0.3mM, ラクテートデヒドロゲナーゼ10U, ピルビン酸キナーゼ25U, ATP 1mM, MSG 10mMを含む溶液に、粗酵素液を加え、30℃における340nmの吸光度変化を測定することによって測定した。ブランクの測定には、上記反応液よりMSGを除いたものを用いた。粗酵素液のタンパク質濃度は、牛血清アルブミンを標準試料として、Protein Assay (Bio-Rad

)を用いて定量した。GS活性増強株では、約3倍にGS活性が向上していることが証明された

【0094】

【表6】

表6 GLS欠損株およびGLS欠損・GS増強株のGLS・GS活性

菌株	ATCC14067	2247 Δ gls	2247 Δ gls glnA14
GLS (U/mg)	0.19	0.012	0.014
GS (U/mg)	0.019	0.019	0.063

【0095】

(4) GLS活性低下・GS活性増強株の培養評価

ブレヴィバクテリウム・フラバムATCC14067株、2247 Δ gls株および2247 Δ gls glnA14株を用いてL-グルタミン生産のための培養を以下のように行った。CM2Gプレート培地にて培養して得たATCC14067株および2247 Δ gls株の菌体を、グルコース100g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60g、 KH_2PO_4 2.5g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g、 $\text{VB}_1 \cdot \text{HCl}$ 350 μ g、ビオチン 4 μ g、大豆加水分解物200mg、 CaCO_3 50gを純水1Lに含む培地 (NaOHでpH6.8に調整されている) に接種し、31.5℃にて培地中の糖が消費されるまでしんとう培養した。

【0096】

培養終了後、培養液中のL-グルタミン蓄積量は、培養液を適当に希釈した後、液体クロマトグラフィーにより分析した。また、L-グルタミン酸の蓄積量は、培養液を適当に希釈後、バイオテックアナライザーAS210 (旭化成) にて分析した。このときの結果を表7に示した。

【0097】

2247 Δ gls glnA14株では、2247 Δ gls株に比べてさらに収率の向上が認められた。これらの結果から、L-グルタミンの生産においてGLS活性の消失または低下に加えて、GS活性の増強が有効であることが示された。

【0098】

【表7】

表7 GLS欠損株およびGLS欠損・GS増強株によるL-グルタミン生産

菌株	OD620(X101)	Gln(g/L)	Glu(g/L)	Gln収率(%)
ATCC14067	0.469	13.4	35.2	13.8
2247Δgls	0.456	18.8	31.0	19.2
2247Δgls glnA14	0.436	24.4	26.0	24.9

【0099】

【参考例】

(1) 公知のL-グルタミン酸生産菌のグルタミナーゼ活性の測定

公知のL-グルタミン生産菌としては、ビタミンP活性物質に耐性を付与されたAJ11576, AJ11577 (特開昭56-164792)、 α -ケトマロン酸耐性を付与されたAJ11573, AJ11574 (特開昭56-151495)、グルタミン酸を含有するペプチドに耐性を付与されたAJ12418, AJ12419 (特開平2-186994) などがある。そこで、これらL-グルタミン生産菌及び実施例4で得られた2247Δgls glnA14株のGLS活性を、実施例1記載の方法で測定した。その結果を表8に示す。これら公知のL-グルタミン生産株では、いずれも有意なGLS活性を保持していた。

【0100】

【表8】

表8 公知のL-グルタミン生産菌のGLS活性

	菌株	GLS活性(U/mg)
Brevibacterium flavum	ATCC14067	0.19
Corynebacterium glutamicum	ATCC13032	0.17
Brevibacterium flavum	2247Δgls glnA14	0.010

Brevibacterium flavum	AJ11576	0.21
Corynebacterium glutamicum	AJ11577	0.14
Brevibacterium flavum	AJ11573	0.13
Corynebacterium glutamicum	AJ11574	0.18
Brevibacterium flavum	AJ12418	0.16
Corynebacterium acetoacidophilum	AJ12419	0.20

【 0 1 0 1 】

【発明の効果】

本発明により、コリネ型細菌の L - グルタミン生産性を向上させることができる。

【 0 1 0 2 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Ajinomoto Co., Inc.

<120> L - グルタミンの製造法及び L - グルタミン生産菌 (Method for Producing L-Glutamine and L-Glutamine Producing Bacteria)

<130> P-B0262

<140>

<141> 2002-11-26

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 2100

<212> DNA

<213> Brevibacterium flavum

<220>

<221> CDS

<222> (674)..(1999)

<400> 1

cacaaaatcc ggcgaatcca ccgaaatcgt cttcatcttt ggcttgatca aatgcctcat 60
tcggcccggc tgcaccgtca cgcttcgaga aatagaaata gcgcttgctg acgccacccc 120
actctcaacg gcagccgcca gcgcgtggca tcagcccagg atttattagg accggcgata 180
taggtaatgg agtggcaccc ctgatccacc aaatgcacca cagccttcgc cgtaccgtcg 240
tagttatcca ccatcacgct gggaatacct tgcacttcac ggctcattaa tacagtggga 300
atttcccgcg cgactttgtg gatctcacca gaatccatcc ttgaagcagc gagcaataag 360
ccatcggcgt gggggacgat cttgtccagc acctccctgg acttaatcgc cgactcccgg 420
gcgtcgacaa gcgcaaccgt atagccctga gtgcttgagg catgctgcgc gccctggaaa 480
atttccaaga agaagggatt cgatgcatcg gtggcaacca tagcgatgat accggtgttt 540
tggcgctgaa aagcctgagt ttccacacgc gttgcggatt ttctccgcag tggaaaaact 600
cactcgccca ggctgcgaaa acgcccgcga cacagtggaa ggggagacgc cagcgacttt 660
tgcgacatca taa atg gtg gct ttt gag tcg ctg tgg ccc cag aat ctg 709

Met Val Ala Phe Glu Ser Leu Trp Pro Gln Asn Leu

1

5

10

tca tgc aca aga gta tat agc gca aaa gaa atc act agt ctt gat tct 757
Ser Cys Thr Arg Val Tyr Ser Ala Lys Glu Ile Thr Ser Leu Asp Ser

15

20

25

atg ttg acg atg ccg ata ccc gag tac ctg cac gaa att tta gat gat 805
Met Leu Thr Met Pro Ile Pro Glu Tyr Leu His Glu Ile Leu Asp Asp

30	35	40	
gtc cgc gac acc acc tcc ggc gag ttg gcc gat tac atc ccg gaa cta	853		
Val Arg Asp Thr Thr Ser Gly Glu Leu Ala Asp Tyr Ile Pro Glu Leu			
45	50	55	60
aaa tct gcc gac cca aac ccg ctg gca gta gcc ctg tgc acc gtt aac	901		
Lys Ser Ala Asp Pro Asn Pro Leu Ala Val Ala Leu Cys Thr Val Asn			
65	70	75	
gga cac atc tac agc gca ggc gat gac gac atc gaa ttc acc atg caa	949		
Gly His Ile Tyr Ser Ala Gly Asp Asp Asp Ile Glu Phe Thr Met Gln			
80	85	90	
agt att tcc aag ccc ttt gcc tac gca ctc gca ctc caa gaa tgc ggc	997		
Ser Ile Ser Lys Pro Phe Ala Tyr Ala Leu Ala Leu Gln Glu Cys Gly			
95	100	105	
ttt gat gag gtc tct gca tcc gtg gcc ttg gaa ccc tcc ggt gag gcc	1045		
Phe Asp Glu Val Ser Ala Ser Val Ala Leu Glu Pro Ser Gly Glu Ala			
110	115	120	
ttc aac gaa ctt tcc ctc gac ggc gaa aac cgc ccc atg aac ccc atg	1093		
Phe Asn Glu Leu Ser Leu Asp Gly Glu Asn Arg Pro Met Asn Pro Met			
125	130	135	140
atc aac gcc ggc gcg atc gcc atc aac cag ctg atc aac ggc tcc gac	1141		
Ile Asn Ala Gly Ala Ile Ala Ile Asn Gln Leu Ile Asn Gly Ser Asp			
145	150	155	
tcc acc gtg gaa gac cga gtg gaa aaa atc cga cac tac ttc tct gaa	1189		
Ser Thr Val Glu Asp Arg Val Glu Lys Ile Arg His Tyr Phe Ser Glu			
160	165	170	
ctt gct gga cgc gaa ctc acc atc gac cgc gtg ctt gcc gaa tcc gaa	1237		
Leu Ala Gly Arg Glu Leu Thr Ile Asp Arg Val Leu Ala Glu Ser Glu			
175	180	185	
ctc gcc ggc gcc gac cgc aac ctc tcc atc gcc cac atg ctg cgc aac	1285		

Leu Ala Gly Ala Asp Arg Asn Leu Ser Ile Ala His Met Leu Arg Asn
 190 195 200
 tat ggc gtc atc gaa gac gaa gcc cac gac gcc gtc ctc agc tac acg 1333
 Tyr Gly Val Ile Glu Asp Glu Ala His Asp Ala Val Leu Ser Tyr Thr
 205 210 215 220
 ctg caa tgt gcc atc aaa gta acc acg cgc gac ctc gca gtc atg acc 1381
 Leu Gln Cys Ala Ile Lys Val Thr Thr Arg Asp Leu Ala Val Met Thr
 225 230 235
 gcc acg ctc gcc gcc ggc ggc acg cac cca att acc ggc aag aag ctt 1429
 Ala Thr Leu Ala Ala Gly Gly Thr His Pro Ile Thr Gly Lys Lys Leu
 240 245 250
 ctc gac gcc cgc gtc tgc cgc ctc acc ctc tcc gtc atg gct tca gca 1477
 Leu Asp Ala Arg Val Cys Arg Leu Thr Leu Ser Val Met Ala Ser Ala
 255 260 265
 ggc atg tac gac gag gca ggg cag tgg ctc tcc acc gta ggc atc ccc 1525
 Gly Met Tyr Asp Glu Ala Gly Gln Trp Leu Ser Thr Val Gly Ile Pro
 270 275 280
 gcg aaa tca gga gtc gcc ggc gga ctc atc ggc att ctg cca ggt cag 1573
 Ala Lys Ser Gly Val Ala Gly Gly Leu Ile Gly Ile Leu Pro Gly Gln
 285 290 295 300
 ctg ggc atc gcc aca ttt tcc cca cgc ctg aac ccc aaa ggc aac agc 1621
 Leu Gly Ile Ala Thr Phe Ser Pro Arg Leu Asn Pro Lys Gly Asn Ser
 305 310 315
 gtg cgc ggc gta aaa ata ttc aaa cag ctt tcc gac gac atg ggc ctc 1669
 Val Arg Gly Val Lys Ile Phe Lys Gln Leu Ser Asp Asp Met Gly Leu
 320 325 330
 cac ctt atg tcc acc gag cag gta tcc ggc cac gca gta cga tcc att 1717
 His Leu Met Ser Thr Glu Gln Val Ser Gly His Ala Val Arg Ser Ile
 335 340 345

acg cgg gac ggc gac acc acc ttc atc caa atg cag ggc gcc atg aac 1765
 Thr Arg Asp Gly Asp Thr Thr Phe Ile Gln Met Gln Gly Ala Met Asn
 350 355 360
 ttc tca gcc agc gaa agc ttc ctc cac gcc atc gtg gaa cac aac ttt 1813
 Phe Ser Ala Ser Glu Ser Phe Leu His Ala Ile Val Glu His Asn Phe
 365 370 375 380
 gaa ggc acc gaa gtt gtt ctt gat ctc acc cga gta ctt agc ttc cac 1861
 Glu Gly Thr Glu Val Val Leu Asp Leu Thr Arg Val Leu Ser Phe His
 385 390 395
 ccc gta gcc atc cgc atg atc aaa gaa ggc ctc aaa cgc atc cgc gac 1909
 Pro Val Ala Ile Arg Met Ile Lys Glu Gly Leu Lys Arg Ile Arg Asp
 400 405 410
 gca ggc ttt gag gtg ttc atc ctc gac cca gat gac gta ctg ccc gat 1957
 Ala Gly Phe Glu Val Phe Ile Leu Asp Pro Asp Asp Val Leu Pro Asp
 415 420 425
 ttc atg ttt tcc gac ggc acc atc tgc aaa gaa cga gtg tga 1999
 Phe Met Phe Ser Asp Gly Thr Ile Cys Lys Glu Arg Val
 430 435 440
 ccggtagctt tatggtctga acaattcgaa ggagattaat cggtgaaaaa gaagcttatg 2059
 ttgcctttga ttgttcgacg tttgggatta agtgcctgca g 2100

<210> 2

<211> 441

<212> PRT

<213> Brevibacterium flavum

<400> 2

Met Val Ala Phe Glu Ser Leu Trp Pro Gln Asn Leu Ser Cys Thr Arg

1

5

10

15

Val Tyr Ser Ala Lys Glu Ile Thr Ser Leu Asp Ser Met Leu Thr Met
 20 25 30
 Pro Ile Pro Glu Tyr Leu His Glu Ile Leu Asp Asp Val Arg Asp Thr
 35 40 45
 Thr Ser Gly Glu Leu Ala Asp Tyr Ile Pro Glu Leu Lys Ser Ala Asp
 50 55 60
 Pro Asn Pro Leu Ala Val Ala Leu Cys Thr Val Asn Gly His Ile Tyr
 65 70 75 80
 Ser Ala Gly Asp Asp Asp Ile Glu Phe Thr Met Gln Ser Ile Ser Lys
 85 90 95
 Pro Phe Ala Tyr Ala Leu Ala Leu Gln Glu Cys Gly Phe Asp Glu Val
 100 105 110
 Ser Ala Ser Val Ala Leu Glu Pro Ser Gly Glu Ala Phe Asn Glu Leu
 115 120 125
 Ser Leu Asp Gly Glu Asn Arg Pro Met Asn Pro Met Ile Asn Ala Gly
 130 135 140
 Ala Ile Ala Ile Asn Gln Leu Ile Asn Gly Ser Asp Ser Thr Val Glu
 145 150 155 160
 Asp Arg Val Glu Lys Ile Arg His Tyr Phe Ser Glu Leu Ala Gly Arg
 165 170 175
 Glu Leu Thr Ile Asp Arg Val Leu Ala Glu Ser Glu Leu Ala Gly Ala
 180 185 190
 Asp Arg Asn Leu Ser Ile Ala His Met Leu Arg Asn Tyr Gly Val Ile
 195 200 205
 Glu Asp Glu Ala His Asp Ala Val Leu Ser Tyr Thr Leu Gln Cys Ala
 210 215 220
 Ile Lys Val Thr Thr Arg Asp Leu Ala Val Met Thr Ala Thr Leu Ala
 225 230 235 240
 Ala Gly Gly Thr His Pro Ile Thr Gly Lys Lys Leu Leu Asp Ala Arg

	245		250		255										
Val	Cys	Arg	Leu	Thr	Leu	Ser	Val	Met	Ala	Ser	Ala	Gly	Met	Tyr	Asp
	260		265		270										
Glu	Ala	Gly	Gln	Trp	Leu	Ser	Thr	Val	Gly	Ile	Pro	Ala	Lys	Ser	Gly
	275		280		285										
Val	Ala	Gly	Gly	Leu	Ile	Gly	Ile	Leu	Pro	Gly	Gln	Leu	Gly	Ile	Ala
	290		295		300										
Thr	Phe	Ser	Pro	Arg	Leu	Asn	Pro	Lys	Gly	Asn	Ser	Val	Arg	Gly	Val
305			310		315									320	
Lys	Ile	Phe	Lys	Gln	Leu	Ser	Asp	Asp	Met	Gly	Leu	His	Leu	Met	Ser
	325		330		335										
Thr	Glu	Gln	Val	Ser	Gly	His	Ala	Val	Arg	Ser	Ile	Thr	Arg	Asp	Gly
	340		345		350										
Asp	Thr	Thr	Phe	Ile	Gln	Met	Gln	Gly	Ala	Met	Asn	Phe	Ser	Ala	Ser
	355		360		365										
Glu	Ser	Phe	Leu	His	Ala	Ile	Val	Glu	His	Asn	Phe	Glu	Gly	Thr	Glu
	370		375		380										
Val	Val	Leu	Asp	Leu	Thr	Arg	Val	Leu	Ser	Phe	His	Pro	Val	Ala	Ile
385			390		395									400	
Arg	Met	Ile	Lys	Glu	Gly	Leu	Lys	Arg	Ile	Arg	Asp	Ala	Gly	Phe	Glu
	405		410		415										
Val	Phe	Ile	Leu	Asp	Pro	Asp	Asp	Val	Leu	Pro	Asp	Phe	Met	Phe	Ser
	420		425		430										
Asp	Gly	Thr	Ile	Cys	Lys	Glu	Arg	Val							
	435		440												

<210> 3

<211> 2500

<212> DNA

<213> Brevibacterium flavum

<220>

<221> CDS

<222> (874).. (2307)

<400> 3

```

ctctgtgcgg ggacgaaaat ttgcaactct cgctttgtct agctagatca accccaacca 60
agcacgaagg gcgtcgatcc ccgcaaagat cggcgcccat aaatttact caagacaaat 120
taccgcgga taactgcagt tccgttgcc ttgtcgtgga gcccacggcc gtcagcatcc 180
accatcacgg caggcagaat caaatggtc agcagtggac gaaccagcgc acgccaccaa 240
cccacacgct cctctgcate cacacgcgca aggcccatgc caaacacggc atgacctggg 300
gtgcgagcaa agatccatcc cgttagccaa cccaggatca cgaaaataat gagcgtggat 360
gtcgtacat cgcccagcac atccgtgaaa ttggacagca caatagcaat aaccaggaa 420
acacccagt ccacgcagac cccgccgata cgacgagcca ctgaggacag agagccggcc 480
ccttcttgag gaagcccaa cttttcgcca ggccacctgc cgggcgcate aggatcgtca 540
aatcagctg gaatttcggg tccgtcaagc caacttctct tcggctttgc cattgttaca 600
atcaaatcca aacatgtaga gggcggatac tgcagtcaaa aggcgttgcc tttagacgtc 660
gcaaagcgca atttctacc tttaagatcc taatctgttg aggtcagcca caatttttca 720
gaaaagtttt gatagatcga caggtaatgc attatactga caacgtcgca aggactacat 780
ttgcagccaa gtctactact tgatcttcaa aggtcagcaa ttgtgaacaa agctacaaat 840
aaaccgttcc acccatgtca atgaggagtc acc gtg gcg ttt gaa acc ccg gaa 894

```

Val Ala Phe Glu Thr Pro Glu

1

5

```

gaa att gtc aag ttc atc aag gat gaa aac gtc gag ttc gtt gac gtt 942
Glu Ile Val Lys Phe Ile Lys Asp Glu Asn Val Glu Phe Val Asp Val

```

10

15

20

```

cga ttc acc gac ctt ccc ggc acc gag cag cac ttc agc atc cca gct 990
Arg Phe Thr Asp Leu Pro Gly Thr Glu Gln His Phe Ser Ile Pro Ala

```

25	30	35	
gcc agc ttc gat gca gat aca gtc gaa gaa ggt ctc gca ttc gac gga	1038		
Ala Ser Phe Asp Ala Asp Thr Val Glu Glu Gly Leu Ala Phe Asp Gly			
40	45	50	55
tcc tcg atc cgt ggc ttc acc acg atc gac gaa tct gac atg aat ctc	1086		
Ser Ser Ile Arg Gly Phe Thr Thr Ile Asp Glu Ser Asp Met Asn Leu			
60	65	70	
ctg cca gac ctc gga acg gcc acc ctt gat cca ttc cgc aag gca aag	1134		
Leu Pro Asp Leu Gly Thr Ala Thr Leu Asp Pro Phe Arg Lys Ala Lys			
75	80	85	
acc ctg aac gtt aag ttc ttc gtt cac gat cct ttc acc cgc gag gca	1182		
Thr Leu Asn Val Lys Phe Phe Val His Asp Pro Phe Thr Arg Glu Ala			
90	95	100	
ttc tcc cgc gac cca cgc aac gta gca cgc aag gca gag cag tac ctg	1230		
Phe Ser Arg Asp Pro Arg Asn Val Ala Arg Lys Ala Glu Gln Tyr Leu			
105	110	115	
gca tcc acc ggc att gca gac acc tgc aac ttc ggc gcc gag gct gag	1278		
Ala Ser Thr Gly Ile Ala Asp Thr Cys Asn Phe Gly Ala Glu Ala Glu			
120	125	130	135
ttc tac ctc ttc gac tcc gtt cgc tac tcc acc gag atg aac tcc ggc	1326		
Phe Tyr Leu Phe Asp Ser Val Arg Tyr Ser Thr Glu Met Asn Ser Gly			
140	145	150	
ttc tac gaa gta gat acc gaa gaa ggc tgg tgg aac cgt ggc aag gaa	1374		
Phe Tyr Glu Val Asp Thr Glu Glu Gly Trp Trp Asn Arg Gly Lys Glu			
155	160	165	
acc aac ctc gac gga acc cca aac ctg ggc gca aag aac cgc gtc aag	1422		
Thr Asn Leu Asp Gly Thr Pro Asn Leu Gly Ala Lys Asn Arg Val Lys			
170	175	180	
ggt ggc tac ttc cca gta gca cca tac gac caa acc gtt gac gtg cgc	1470		

Gly Gly Tyr Phe Pro Val Ala Pro Tyr Asp Gln Thr Val Asp Val Arg
 185 190 195
 gat gac atg gtt cgc aac ctc gca gct tcc ggc ttc gct ctt gag cgt 1518
 Asp Asp Met Val Arg Asn Leu Ala Ala Ser Gly Phe Ala Leu Glu Arg
 200 205 210 215
 ttc cac cac gaa gtc ggt ggc gga cag cag gaa atc aac tac cgc ttc 1566
 Phe His His Glu Val Gly Gly Gly Gln Gln Glu Ile Asn Tyr Arg Phe
 220 225 230
 aac acc atg ctc cac gcg gca gat gat atc cag acc ttc aag tac atc 1614
 Asn Thr Met Leu His Ala Ala Asp Asp Ile Gln Thr Phe Lys Tyr Ile
 235 240 245
 atc aag aac acc gct cgc ctc cac ggc aag gct gca acc ttc atg cct 1662
 Ile Lys Asn Thr Ala Arg Leu His Gly Lys Ala Ala Thr Phe Met Pro
 250 255 260
 aag cca ctg gct ggc gac aac ggt tcc ggc atg cac gct cac cag tcc 1710
 Lys Pro Leu Ala Gly Asp Asn Gly Ser Gly Met His Ala His Gln Ser
 265 270 275
 ctc tgg aag gac ggc aag cca ctc ttc cac gat gag tcc ggc tac gca 1758
 Leu Trp Lys Asp Gly Lys Pro Leu Phe His Asp Glu Ser Gly Tyr Ala
 280 285 290 295
 ggc ctg tcc gac atc gcc cgc tac tac atc ggc ggc atc ctg cac cac 1806
 Gly Leu Ser Asp Ile Ala Arg Tyr Tyr Ile Gly Gly Ile Leu His His
 300 305 310
 gca ggc gct gtt ctg gcg ttc acc aac gca acc ctg aac tcc tac cac 1854
 Ala Gly Ala Val Leu Ala Phe Thr Asn Ala Thr Leu Asn Ser Tyr His
 315 320 325
 cgt ctg gtt cca ggc ttc gag gct cca atc aac ctg gtg tac tca cag 1902
 Arg Leu Val Pro Gly Phe Glu Ala Pro Ile Asn Leu Val Tyr Ser Gln
 330 335 340

cgc aac cgt tcc gct gct gtc cgt atc cca atc acc gga tcc aac cca 1950
 Arg Asn Arg Ser Ala Ala Val Arg Ile Pro Ile Thr Gly Ser Asn Pro
 345 350 355
 aag gca aag cgc atc gaa ttc cgc gct cca gac cca tca ggc aac cca 1998
 Lys Ala Lys Arg Ile Glu Phe Arg Ala Pro Asp Pro Ser Gly Asn Pro
 360 365 370 375
 tac ctg ggc ttc gca gcg atg atg atg gcc ggc ctc gac ggc atc aag 2046
 Tyr Leu Gly Phe Ala Ala Met Met Met Ala Gly Leu Asp Gly Ile Lys
 380 385 390
 aac cgc atc gag cca cac gct cca gtg gac aag gac ctc tac gaa ctg 2094
 Asn Arg Ile Glu Pro His Ala Pro Val Asp Lys Asp Leu Tyr Glu Leu
 395 400 405
 cca cca gag gaa gct gca tcc att cca cag gca cca acc tcc ctg gaa 2142
 Pro Pro Glu Glu Ala Ala Ser Ile Pro Gln Ala Pro Thr Ser Leu Glu
 410 415 420
 gca tcc ctg aag gca ctg cag gaa gac acc gac ttc ctc acc gag tct 2190
 Ala Ser Leu Lys Ala Leu Gln Glu Asp Thr Asp Phe Leu Thr Glu Ser
 425 430 435
 gac gtc ttc acc gag gat ctc atc gag gcg tac atc cag tac aag tac 2238
 Asp Val Phe Thr Glu Asp Leu Ile Glu Ala Tyr Ile Gln Tyr Lys Tyr
 440 445 450 455
 gac aac gag atc tcc cca gtt cgc ctg cgc cca acc ccg cag gaa ttc 2286
 Asp Asn Glu Ile Ser Pro Val Arg Leu Arg Pro Thr Pro Gln Glu Phe
 460 465 470
 gaa ttg tac ttc gac tgc taa ttcacttagc tagccgatag cggaaccccc 2337
 Glu Leu Tyr Phe Asp Cys
 475
 ctgaaattct tcattgaatt tcaggggggtt tcttttttac attccaccta aaaggaaagc 2397
 gccgatcct ccatcatggt ggatccggcg cttttatcta tttgtttttg ggctagatgc 2457

cgatcagttc agatgcaact acatcggaca gtgagacggt tcc

2500

<210> 4

<211> 477

<212> PRT

<213> Brevibacterium flavum

<400> 4

Val Ala Phe Glu Thr Pro Glu Glu Ile Val Lys Phe Ile Lys Asp Glu

1 5 10 15

Asn Val Glu Phe Val Asp Val Arg Phe Thr Asp Leu Pro Gly Thr Glu

20 25 30

Gln His Phe Ser Ile Pro Ala Ala Ser Phe Asp Ala Asp Thr Val Glu

35 40 45

Glu Gly Leu Ala Phe Asp Gly Ser Ser Ile Arg Gly Phe Thr Thr Ile

50 55 60

Asp Glu Ser Asp Met Asn Leu Leu Pro Asp Leu Gly Thr Ala Thr Leu

65 70 75 80

Asp Pro Phe Arg Lys Ala Lys Thr Leu Asn Val Lys Phe Phe Val His

85 90 95

Asp Pro Phe Thr Arg Glu Ala Phe Ser Arg Asp Pro Arg Asn Val Ala

100 105 110

Arg Lys Ala Glu Gln Tyr Leu Ala Ser Thr Gly Ile Ala Asp Thr Cys

115 120 125

Asn Phe Gly Ala Glu Ala Glu Phe Tyr Leu Phe Asp Ser Val Arg Tyr

130 135 140

Ser Thr Glu Met Asn Ser Gly Phe Tyr Glu Val Asp Thr Glu Glu Gly

145 150 155 160

Trp Trp Asn Arg Gly Lys Glu Thr Asn Leu Asp Gly Thr Pro Asn Leu

165	170	175
Gly Ala Lys Asn Arg Val Lys Gly Gly Tyr Phe Pro Val Ala Pro Tyr		
180	185	190
Asp Gln Thr Val Asp Val Arg Asp Asp Met Val Arg Asn Leu Ala Ala		
195	200	205
Ser Gly Phe Ala Leu Glu Arg Phe His His Glu Val Gly Gly Gly Gln		
210	215	220
Gln Glu Ile Asn Tyr Arg Phe Asn Thr Met Leu His Ala Ala Asp Asp		
225	230	235
Ile Gln Thr Phe Lys Tyr Ile Ile Lys Asn Thr Ala Arg Leu His Gly		
245	250	255
Lys Ala Ala Thr Phe Met Pro Lys Pro Leu Ala Gly Asp Asn Gly Ser		
260	265	270
Gly Met His Ala His Gln Ser Leu Trp Lys Asp Gly Lys Pro Leu Phe		
275	280	285
His Asp Glu Ser Gly Tyr Ala Gly Leu Ser Asp Ile Ala Arg Tyr Tyr		
290	295	300
Ile Gly Gly Ile Leu His His Ala Gly Ala Val Leu Ala Phe Thr Asn		
305	310	315
Ala Thr Leu Asn Ser Tyr His Arg Leu Val Pro Gly Phe Glu Ala Pro		
325	330	335
Ile Asn Leu Val Tyr Ser Gln Arg Asn Arg Ser Ala Ala Val Arg Ile		
340	345	350
Pro Ile Thr Gly Ser Asn Pro Lys Ala Lys Arg Ile Glu Phe Arg Ala		
355	360	365
Pro Asp Pro Ser Gly Asn Pro Tyr Leu Gly Phe Ala Ala Met Met Met		
370	375	380
Ala Gly Leu Asp Gly Ile Lys Asn Arg Ile Glu Pro His Ala Pro Val		
385	390	395
		400

Asp Lys Asp Leu Tyr Glu Leu Pro Pro Glu Glu Ala Ala Ser Ile Pro
405 410 415
Gln Ala Pro Thr Ser Leu Glu Ala Ser Leu Lys Ala Leu Gln Glu Asp
420 425 430
Thr Asp Phe Leu Thr Glu Ser Asp Val Phe Thr Glu Asp Leu Ile Glu
435 440 445
Ala Tyr Ile Gln Tyr Lys Tyr Asp Asn Glu Ile Ser Pro Val Arg Leu
450 455 460
Arg Pro Thr Pro Gln Glu Phe Glu Leu Tyr Phe Asp Cys
465 470 475

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 5

cacaaaatcc ggcgaatcca

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 6

ctgcaggcac ttaatcccaa

20

<210> 7

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 7

ccggcgagtt cggattcaaa gccgcattct tgg

33

<210> 8

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 8

ctccaagaat gcggctttga atccgaactc gccgg

35

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 9

ctcccgggcg tcgacaagcg caacc

25

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 10

gccccgggggt ggaagctaag tactc

25

<210> 11

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 11

cgccccgggtt cactgagcg tcagac

26

<210> 12

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 12

gacccgggat cccgtcgttt tacaac

26

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 13

agatcggcgc ccataaat t c

21

<210> 14

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 14

ccccccgggg gtaactgcag ttcccgttgc

30

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 15

gtttgggggtt ccgtcgaggt tgg

24

<210> 16

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 16

cccccggggt tccaccagcc ttcttc

26

<210> 17

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 17

cagaaaagtt gccatagatc gacaggtaat gctataatct gacaacgtcg c 51

<210> 18

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 18

gcgacgttgt cagattatag cattacctgt cgatctatgg caacttttct g 51

<210> 19

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 19

ggggtcgacg gatcgacagg taatgcatt

29

<210> 20

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 20

ggggtcgacg gatccaccat gatggagga

29

【図面の簡単な説明】

【図 1】 グルタミナーゼ遺伝子を含むプラスミド pHMKGLS5 の構築過程を示す図。

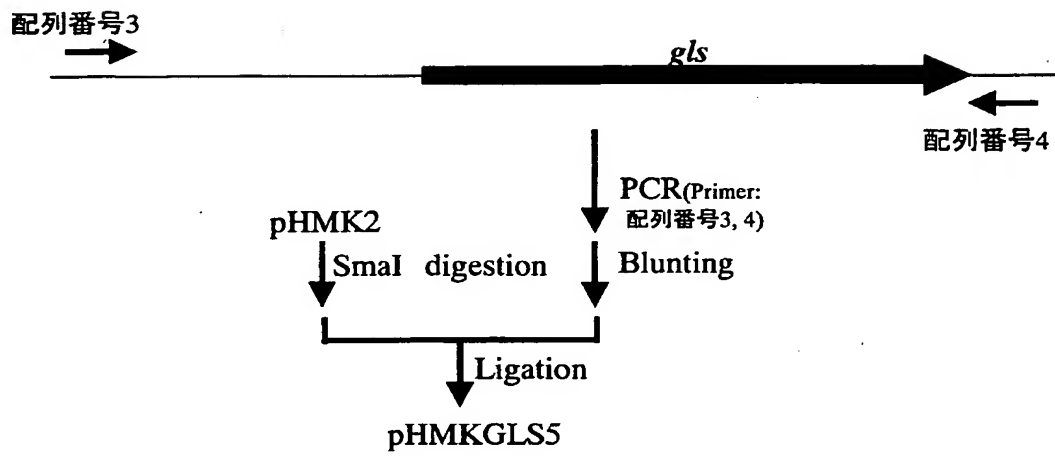
【図 2】 コリネ型細菌で自律複製可能な領域を含まないプラスミド pNEL の構築過程を示す図。

【図 3】 gls 破壊用プラスミド pNEL Δ gls の構築過程を示す図。

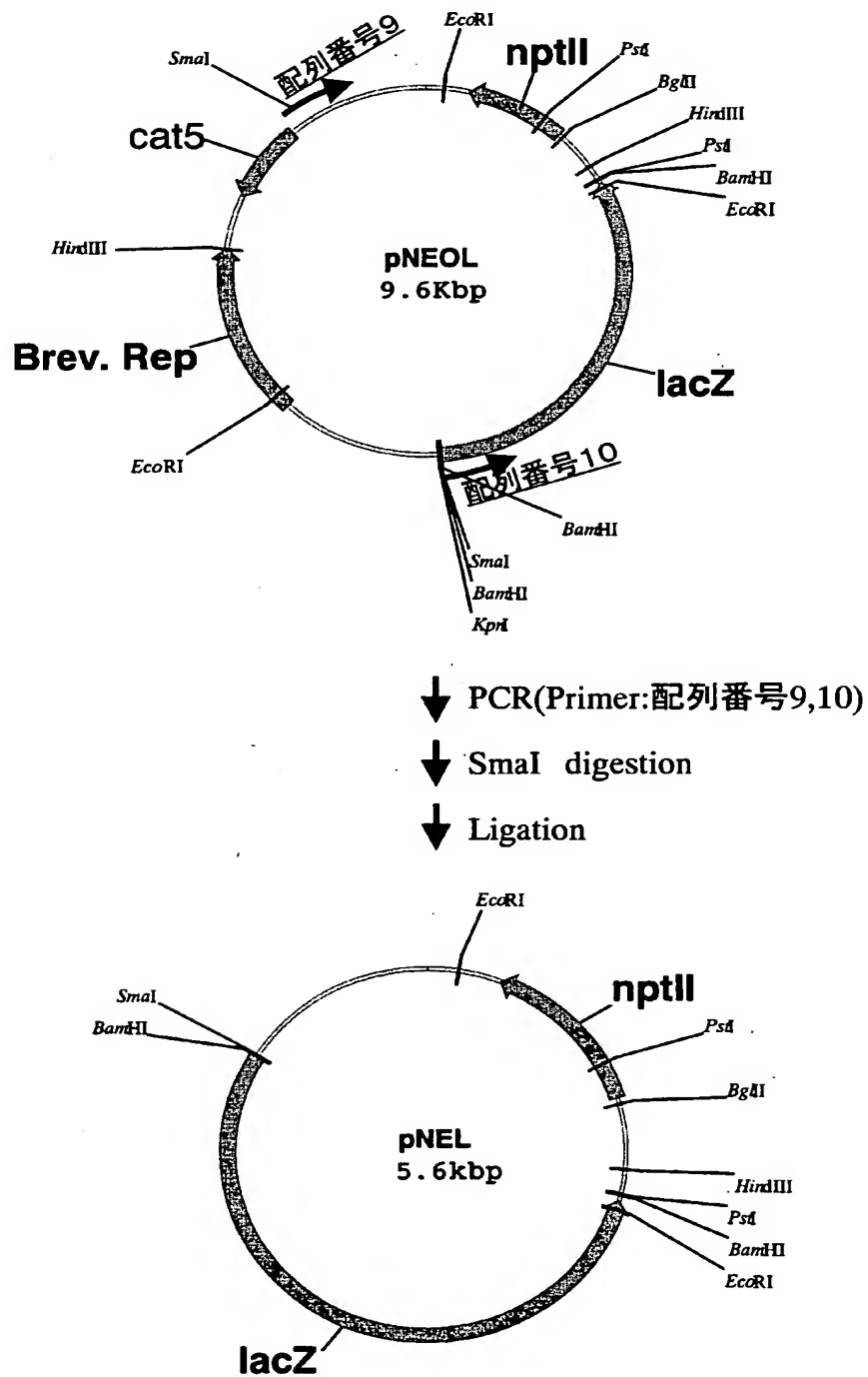
【図 4】 発現が増強された GS 遺伝子を持つプラスミド pNELglnA14 の構築過程を示す図。

【書類名】 図面

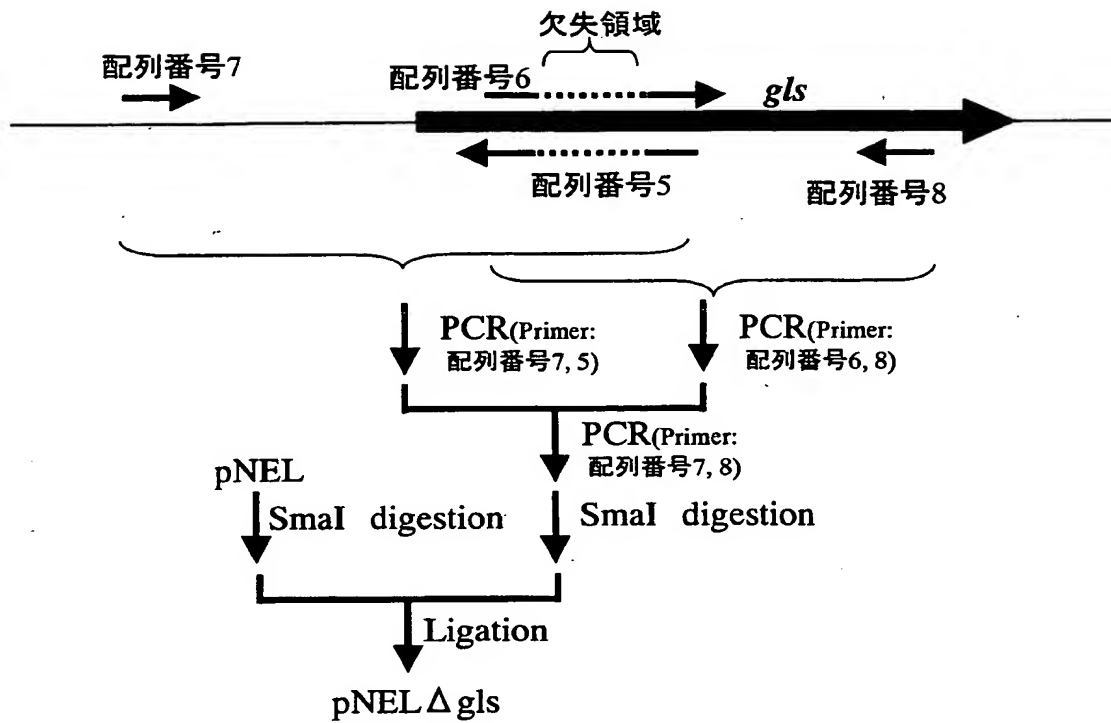
【図 1】



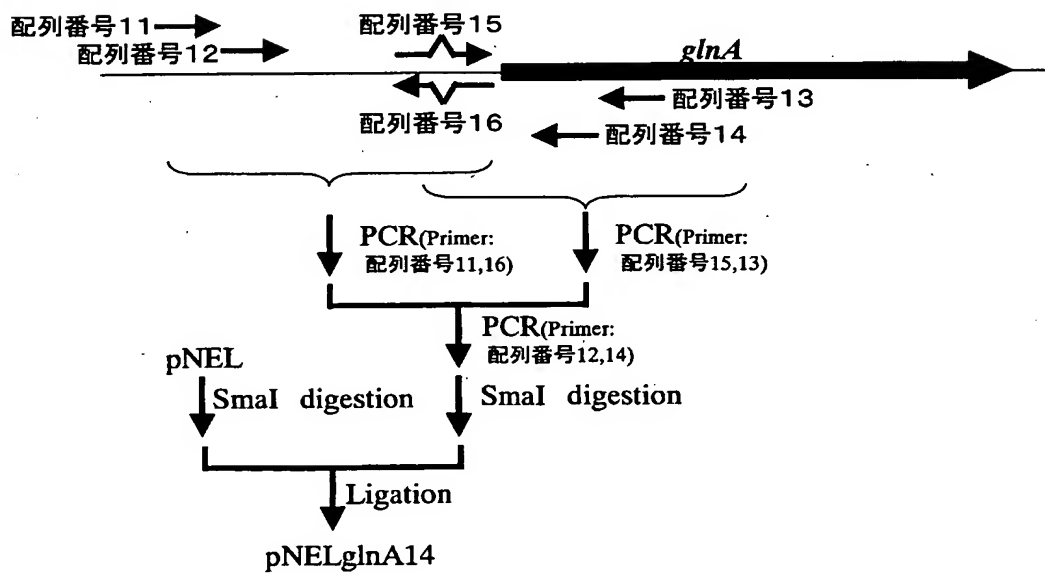
【図2】



【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 L-グルタミン分解能が低下し、L-グルタミン生産能が向上したコリネ型細菌、及びそれを用いたL-グルタミンの製造法を提供する。

【解決手段】 L-グルタミン生産能を有し、細胞内のグルタミナーゼ活性が低下し、好ましくはさらに細胞内のグルタミンシンテターゼ活性が増強するように改変されたコリネ型細菌を培地に培養し、該培地中にL-グルタミンを生成蓄積せしめ、これを採取することにより、L-グルタミンを製造する。

【選択図】 図1

特願 2002-342287

出願人履歴情報

識別番号

[000000066]

1. 変更年月日

1991年 7月 2日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都中央区京橋1丁目15番1号

氏 名

味の素株式会社

2. 変更年月日

2003年 5月12日

[変更理由]

名称変更

住所変更

住 所

東京都中央区京橋1丁目15番1号

氏 名

味の素株式会社